



UJI TOKSISITAS EKSTRAK PIGMEN KASAR MIKROALGA *Spirulina platensis* DENGAN METODE UJI BSLT (*BRINE SHRIMP LETHALITY TEST*)

Rani Agustian R., Ervia Yudiati, Sri Sedjati^{*)}

*Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698*

email:nienierani@gmail.com

Abstrak

Spirulina platensis merupakan jenis mikroalga yang kaya akan sumber nutrisi dan ekstraknya potensial sebagai antioksidan, antimikroba, antivirus, antiinflamasi dan antitumor. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan toksisitas ekstrak metanol dan pigmen kasar (metanol-aseton dan fraksi dietil eter) dari *S. platensis* terhadap nauplii *Artemia* sp. umur 24 jam pada instar III sebagai antitumor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus-Oktober 2011 di Laboratorium Mikroalga, Marine Station, Universitas Diponegoro Teluk Awur Jepara. Uji toksisitas ekstrak metanol dan pigmen kasar (metanol-aseton dan fraksi dietil eter) dilakukan dengan menghitung nilai LC_{50} -24 jam dengan metode uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan identifikasi pigmen dilakukan dengan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Hasil uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) ekstrak metanol dan pigmen kasar (metanol-aseton dan fraksi dietil eter) memperlihatkan bahwa nilai LC_{50} -24 jam dari masing-masing ekstrak yaitu ekstrak metanol (446,68 ppm), ekstrak pigmen kasar metanol-aseton (134,9 ppm) dan ekstrak pigmen kasar fraksi dietil eter (91,2 ppm). LC_{50} -24 jam < 1000 ppm memperlihatkan bahwa ekstrak bersifat toksis terhadap nauplii *Artemia* sp. umur 24 jam pada instar III dan berpotensi sebagai senyawa antitumor. Hasil identifikasi pigmen menunjukkan bahwa *S. platensis* mengandung pigmen karotenoid dan klorofil a.

Kata kunci : *S. platensis*, Ekstrak pigmen kasar, LC_{50} -24 jam

Abstract

Spirulina platensis is a microalgae which rich of nutrients and has a potential extracts as an antioxidant, antimicrobial, antiviral, anti-inflamatory and antitumor. The aims of this research were to determine toxicity of methanol extract and crude pigment (methanol-acetone and diethyl ether fractions) of *S. platensis* against nauplii *Artemia* sp. aged 24 hour at 3rd instar as an antitumor. The aims of this research were to determine toxicity of methanol extract and crude pigment (methanol-acetone and diethyl ether fractions) of *S. platensis* against nauplii *Artemia* sp. The research was conducted in August-October 2011 at Microalgae Laboratory, Marine Station, Diponegoro University Teluk Awur Jepara. Toxicity test methanol and crude pigment extract calculated by LC_{50} -24 hour with BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) methodes and pigment analysis was carried out by TLC (Thin Layer Chromatography). The results of BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) methanol extracts and crude pigment (methanol-acetone and diethyl ether fractions) showed that LC_{50} -24 hour values of each extract methanol (446,68 ppm), crude pigment extract ethanol-acetone (134.9 ppm) and a crude fraction pigment extract diethyl ether (91.2 ppm). The crude pigment has a cytotoxic effect LC_{50} -24 hours <1000 ppm showed that the extracts are toxic to nauplii *Artemia* sp. 24 hours, 3rd instar and has a potential antitumor compounds. The results of pigments identification showed contains carotenoids and chlorophyll a.

Keywords : *S. platensis*, Crude pigment extracts, LC_{50} -24 hour

^{*)} Penulis penanggung jawab

PENDAHULUAN

Spirulina platensis adalah mikroalga hijau biru termasuk ke dalam kelompok cyanobacteria yang digolongkan ke dalam kelas cyanophyceae, mikroalga berfilamen

dan multiseluler (Tomaselli, 1997). *S. platensis* menghasilkan berbagai senyawa aktif yang bernilai tinggi seperti protein, asam lemak esensial (γ *Linoleic Acid*), vitamin, mineral serta pigmen baik betakaroten dan klorofil a maupun

fikosianin (Spolaore et al., 2006; Henrikson, 2009).

Sejak 5 abad yang lalu pada zaman Aztec kuno di Mexico, *Spirulina* sp. telah dikonsumsi sebagai bahan makanan (Cifferi, 1985). Di Indonesia sendiri *S. platensis* dikembangkan dan diproduksi secara komersial dimanfaatkan sebagai *Food grade* (suplemen makanan) yang aman dikonsumsi oleh manusia (Soni et al., 2010).

Senyawa *biocompound* yang terkandung dalam *S. platensis* seperti betakaroten dapat memodulasi sistem imun dengan meningkatkan meningkatkan limfosit B dalam darah, meningkatkan aktifitas sel NK (Natural Killer) dan TNF- α . Adapun efek antioksidan dari golongan betakaroten berfungsi sebagai pemutus rantai yang mencegah mutasi sel yang menjadi sel kanker (Ravi, et al., 2010). Kandungan yang dimiliki seperti efek antioksidan dan imonumudalasi maka *S. platensis* diduga memiliki potensi sebagai antikanker dan antitumor (Belay, 2002).

Terdapat penelitian terdahulu yang ada kaitannya dengan uji toksisitas dengan mengambil senyawa bioaktifnya seperti Ekstrak dari *Eucheuma alvarezii* yang diujikan terhadap *Artemia salina* sebagai studi pendahuluan antikanker (Nurhayati, 2011). Salah satu perspektif ke depan bahan aktif dalam *S. platensis* sampai saat ini sepanjang yang diketahui belum mendapatkan perhatian, sementara beberapa penelitian menggunakan bahan uji lain, oleh karena itu akan dilakukan penelitian tentang uji toksisitas ekstrak pigmen kasar dengan metode uji BSLT

dengan menggunakan nauplii *Artemia* sp. umur 24 jam pada instar III.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian terdiri dari bahan uji dan hewan uji. Bahan uji yang digunakan adalah *S. platensis* serbuk dan hewan uji berupa nauplii *Artemia* sp. umur 24 jam pada instar III. Jumlah hewan uji yang digunakan adalah 10 ekor untuk tiap wadah yang berupa vial berukuran 10 mL.

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental laboratories dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan konsentrasi dengan tiga kali ulangan (Arikunto, 2002). Data uji toksisitas dianalisis dengan analisa probit untuk mendapatkan nilai LC_{50} -24 jam.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yaitu ekstraksi *S. platensis*, penetasan kista *Artemia* sp., uji toksisitas dan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode yang dilakukan adalah dengan cara ekstraksi melalui proses maserasi. Maserasi awal dilakukan dengan perendaman 10 g *S. platensis* dengan pelarut metanol PA dan homogenisasi menggunakan magnetic stirrer, disaring dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Maserasi metanol-aseton dilakukan dengan ditambahkan pelarut aseton:metanol dengan perbandingan 3:7 v/v. Fraksinasi dietil eter dilakukan dengan menggunakan filtrat maserasi metanol-aseton ditambah dengan pelarut dietil eter PA yang difraksinasi dengan corong pemisah dan ekstrak cair dietil eter dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan ketiga ekstrak tersebut dengan metode uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Uji toksisitas dilakukan berdasarkan metode Meyer *et al.* (1982). Nauplii *Artemia* sp. dipaparkan terhadap larutan ekstrak metanol dan pigmen kasar dengan beberapa konsentrasi (100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 1000 ppm, dan kontrol) selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan dan dihitung mortalitas hewan uji tersebut pada tiap konsentrasi. Nilai LC_{50} -24 jam didapatkan dengan analisis probit dengan metode Hubert dan *Software EPA Probit Analysis Program* 1.5. Uji KLT dilakukan pada ekstrak pigmen kasar metanol-aseton dan ekstrak pigmen kasar dietil eter. Kedua ekstrak tersebut ditotolkan pada plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis) silica gel sebagai fase diam. Fase gerak KLT adalah campuran pelarut heksana: dietil eter: aseton dengan perbandingan (3:2:1 v/v/v) dan dihitung nilai R_f nya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa data probit untuk mengetahui nilai LC_{50} -24 jam dengan menggunakan *Software EPA Probit Analysis Program* 1.5 menunjukkan bahwa ketiga ekstrak menghasilkan nilai LC_{50} -24 jam < 1000 ppm. Hasil pengolahan data menunjukkan bahwa nilai LC_{50} -24 jam dari ekstrak metanol 495,271 ppm; ekstrak pigmen kasar metanol-aseton 100,631 ppm; ekstrak pigmen kasar fraksi dietil eter 65,910 ppm. Nilai LC_{50} -24 jam menggunakan *Software EPA Probit Analysis*

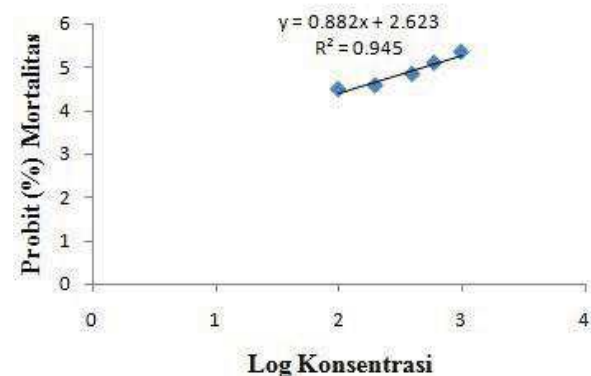
Program dan perhitungan manual disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Validasi Nilai LC_{50} -24 jam

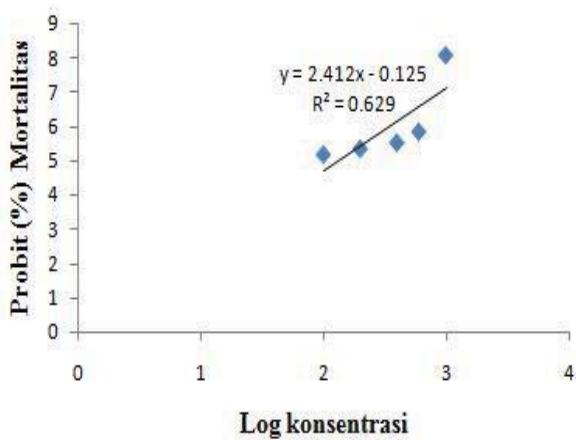
Jenis Ekstrak	Nilai LC_{50} -24 Jam Manual (ppm)	Nilai LC_{50} -24 Jam Software (ppm)	Limit LC_{50} -24 Jam Software (ppm)
Metanol	446,68	495,271	286,087 – 1451,942
Metanol -Aseton	134,9	100,631	32,416 – 162,232
Dietil Eter	91,2	65,910	20,173 – 107,375

Hasil dari ketiga ekstrak menghasilkan nilai LC_{50} -24 jam < 1000 ppm. Aktivitas ketoksikan suatu ekstrak dalam uji BSLT, dianggap berpotensi jika ekstrak tersebut menyebabkan kematian 50% nauplii *Artemia* sp. pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm (Meyer, 1982 dan Anderson, 1991). Pada gambar 1,2 dan 3 menunjukkan hasil dari hubungan analisis regresi log konsentrasi dengan probit % mortalitas ekstrak.

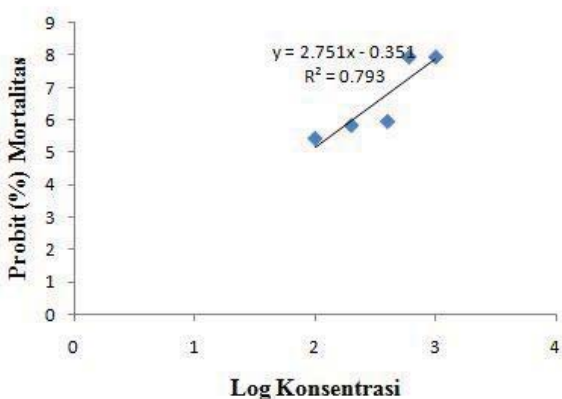
Gambar 1. Analisis Regresi Log Konsentrasi dengan Probit % Mortalitas Ekstrak Metanol



Gambar 2. Analisis Regresi Log Konsentrasi dengan Probit % Mortalitas Ekstrak Metanol-Aseton



Gambar 3. Analisis Regresi Log Konsentrasi dengan Probit % Mortalitas Ekstrak Pigmen Kasar (Fraksi Dietil Eter)



Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula mortalitas hewan uji tersebut. Metode BSLT digunakan untuk meneliti toksisitas ekstrak fungi, tumbuhan, logam berat, pestisida, substansi toksin dari cyanobacteria (Carballo *et al.*, 2002). Pengujian dengan *brine shrimp bioassay* menggunakan nauplii *Artemia* sp. umur 24 jam yang termasuk instar III adalah suatu metode alternatif yang dapat menggantikan penelitian yang menggunakan hewan

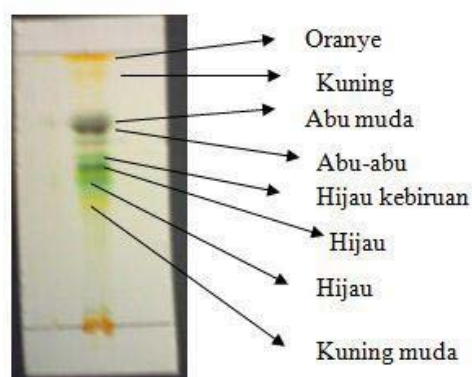
besar, mengurangi angka kesakitan dan stress (Kanwar, 2007).

Harborne (1994), menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi suatu ekstrak maka kematian hewan uji akan semakin tinggi. Kematian hewan uji disebabkan oleh sifat toksik dari ekstrak yang terlarut dalam media hidup hewan uji tersebut. Toksisitas suatu bahan juga dipengaruhi jenis ekstraknya dan komponen yang terdapat dalam ekstrak.

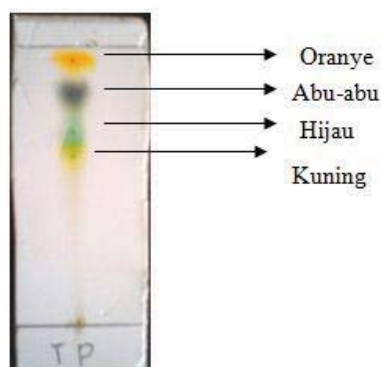
Hasil perhitungan nilai LC_{50} -24 jam diketahui bahwa nilai LC_{50} ekstrak pigmen kasar fraksi dietil eter *S. platensis* (91,2 ppm) lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak metanol (446,68 ppm) dan pigmen kasar metanol-aseton (134,9 ppm). Bahan ekstrak yang terlarut dalam dietil eter adalah bahan yang memiliki sifat yang sama dengan dietil eter (non polar) seperti pigmen yang terkandung pada *S. platensis*. Bahan aktif tersebut yang diperkirakan mempunyai sifat toksis terhadap nauplii *Artemia* sp. yang memberikan tingkat mortalitas lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak pelarut aseton - metanol. Hasil ini diperkuat oleh pernyataan Gross (1991) dalam Yudiati (2011) bahwa pelarut yang digunakan dalam ekstraksi pigmen mampu memecah ikatan kompleks protein-klorofil, ikatan non kovalen dan mengekstraksi pigmen secara kuantitatif. Pigmen yang terkandung dalam *S. platensis* diduga berpotensi sebagai penghambat sel antitumor atau antikanker.

Hasil dari Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis), pola pemisahan warna dapat ditunjukkan dalam Gambar 4 dan Gambar 5.

Gambar 4. Pola Pemisahan Ekstrak Pigmen Kasar (Metanol-Aseton) *S. platensis* pada pelat KLT



Gambar 5. Pola Pemisahan Ekstrak Pigmen Kasar (Fraksi Dietil Eter) *S. platensis* pada Pelat



Warna yang ditunjukkan dalam pemisahan pigmen dengan metode KLT digunakan sebagai dasar untuk identifikasi pigmen. Menurut Gross (1991), bahwa warna kuning-oranye (karoten), hijau biru (klorofil a) dan kuning muda (xantofil). Karotenoid dibedakan menjadi dua golongan utama yaitu, karotenoid polar (xantofil) dan karotenoid non polar (karoten). Wang et al., (1995) menyatakan

bahwa pigmen berwarna abu-abu adalah feofitin a.

Hasil dari perhitungan nilai Rf dari ekstrak metanol-aseton dan dietil eter ditunjukkan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Nilai Rf Ekstrak Metanol-Aseton

Spot	<i>S. platensis</i>			
	Warna	Nilai Rf	Jenis Pigmen	Pustaka
1.	Kuning-oranye	0,975	Karoten	0,6-1 (oranye-karoten) (Britton et al., 1995)
2.	Kuning	0,926	Karoten	0,6-1 (kuning-karoten) (Britton et al., 1995)
3.	Abu-muda	0,707	Feofitin a	0,74-0,82 (abu-abu-feofitin a) (Limantara., 2006)
4.	Abu-abu	0,658	Feofitin a	0,74-0,82 (abu-abu-feofitin a) (Limantara., 2006)
5.	Hijau kebiruan	0,609	Klorofil a	0,74-0,82 (hijau biru-klorofil a) (Limantara., 2006)
6.	Hijau tua	0,561	Klorofil a	0,74-0,829 (hijau-klorofil a) (Limantara., 2006)
7.	Kuning muda	0,512	Xantofil	0,10-0,30 (kuning-xantofil) (Limantara., 2006)

Tabel 3. Nilai Rf Ekstrak Dietil Eter

Spot	<i>S. platensis</i>			
	Warna	Nilai Rf	Jenis Pigmen	Pustaka
1.	Oranye	0,976	Karoten	0,6-0,1 (oranye-karoten) (Britton et al., 1995)
2.	Abu-abu	0,785	Feofitin a	0,74-0,82 (abu-abu-feofitin a) (Limantara., 2006)
3.	Hijau	0,642	Klorofil a	0,74-0,82 (hijau-klorofil a) (Limantara., 2006)
4.	Kuning	0,571	Xantofil	0,10-0,30 (kuning muda-xantofil) (Limantara., 2006)

Fase gerak yang digunakan dalam metode KLT ini adalah heksana:eter:aseton (3:2:1 v/v/v). Fase gerak bersifat nonpolar, sehingga pergerakan karoten lebih cepat dibandingkan pigmen lainnya. Nilai Rf karoten jauh lebih besar daripada pigmen lainnya karena fase gerak pada karoten lebih bersifat nonpolar.

Kesimpulan

Ekstrak pigmen kasar fraksi dietil eter *S. platensis* merupakan ekstrak yang paling toksik terhadap nauplii *Artemia* sp. umur 24 jam pada instar III dengan nilai $LC_{50-24} < 1000$ ppm, yaitu 91.2 ppm dan Senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak pigmen kasar *S. platensis* memberikan pengaruh toksik terhadap hewan uji seperti yang disebutkan pada poin 1, sehingga ekstrak pigmen kasar *S. platensis* dapat diduga sebagai antitumor.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Ir. Ervia Yudiati M.Sc dan Ir Sri Sedjati, M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dalam menyelesaikan jurnal ilmiah ini. Serta semua pihak yang telah memberikan bantuan dan fasilitas dalam penulisan jurnal ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L dan Suffnes, M. 1991. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays And Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochemistry Analysis*. Vol(2): 107-111 pp.
- Arikunto, S.M. 2002. *Prosedur Penelitian*. Rineka Cipta, Jakarta, 342 hlm.
- Belay. 2002. The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Healthmanagement. *Journal of the American Nutraceutical Association*, Vol 5(2): 27- 48 pp.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen dan Pfander, H. 1995. *Carotenoids Volume IA : Isolation and Analysis*. Birkhauser Verlag, Basel Boston, Berlin, 81-84 pp.
- Carballo, J., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M.D. 2002, A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In Vitro Cytotoxicity In Marine Natural Products, *BMC Biotechnol*, Vol 2(1): 17 pp.
- Gross, J. 1991. *Pigment in Vegetables (Chlorophylls and Carotenoids)*. Van Nostrand Reinhold. New York. 775 pp.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung, 354 hlm. (diterjemahkan oleh K. Padwaminata dan I. Soediro).
- Henrikson, R. 2009. *Earth food Spirulina. How This Remarkable Blue Green Algae can Transform Your Health and Our Planet*. Hawaii: Ronore Enterprises.
- Kanwar, A.S. 2007. Brine shrimp *Artemia salina* a marine animal for simple and rapid biological assays. (Review). *Journal of Chinese Clinical Medicine*.
- Limantara dan Heriyanto. 2006. Komposisi dan Kandungan Pigmen Utama Tumbuhan *Cuscuta australis* R.Br dan *Cassytha filiformis* L. *Jurnal Ilmiah Makara Sains*, Vol 10(2): 69-75 hlm.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34 pp.
- Nurhayati, A.P.D., Abdulgani, N dan Febrianto, R. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia Salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Jurnal Akta Kimindo*, Vol 2(1): 41-46 hlm.

- Ravi, M., De, S.L., Azharuddin, S., Paul, S.F.D. 2010. The Beneficial Effects of Spirulina Focusing on Its Immunomodulatory and Antioxidant Properties, Nutrition and Dietary Supplements, Dove Medical Press Ltd, 3-83 pp.
- Spolaore, P., Joannis, C., Duran, E dan Isambert, A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol 101: 87-96 pp.
- Soni, A.F.M., Gunawan A dan Munandar D.S. 2010. Budidaya Masal Spirulina platensis di Perairan Laut Jepara. Prosiding Simposium Nasional Bioteknologi. Bogor: Departemen Budidaya Perairan, FPIK, IPB.
- Tomaselli, L. 1997. Morphology, ultrastructure and taxonomy of Arthrospira and taxonomy of Arthrospira Spirulina platensis. Dalam Avogad, V (Ed). Spirulina platensis (Arthrospira). London.
- Wang B.J., Yu, Z.R dan Hwang, L.S. 1995. Quantitative Analysis of Chlorophylls and Their Derivatives by Thin Layer Chromatography, Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society, Vol 33(5): 550-560 pp.
- Yudiati, E., Sedjati, S., Rizkina, R.A., dan Sunarsih. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar Spirulina sp. Jurnal Ilmiah Ilmu Kelautan, Vol 16(4): 187-192 hlm.